

משרד החקלאות - דו"ח לתוכניות מחקר
לקרן המדען הראשי

קוד זיהוי	א. נושא המחקר (בעברית)
820 - 0311 - 13	ההשפעה של חומרים הומיים על בריאות הדגים במערכות סגורות לגידול דגים

ג. כללי		
מוסד מחקר של החוקר הראשי		
אוניברסיטה העברית		
תאריכים		סוג הדו"ח
תאריך משלוח הדו"ח למקורות המימון	תקופת המחקר	
	עבורה מוגש הדו"ח	
שנה חודש 5 / 16	סיום	התחלה
	שנה חודש 1 / 16	שנה חודש 1 / 13
מסכם		

ב. צוות החוקרים		
שם פרטי	שם משפחה	
יאפ	ואן ריין	חוקר ראשי
חוקרים משניים		
רמי	אבטליון	1
מיכאל	בוריסובר	2
		3
		4
		5
		6
		7

ד. מקורות מימון עבורם מיועד הדו"ח		
שם מקור המימון	קוד מקור מימון	סכום שאושר למחקר בשנת תיקצוב הדו"ח בשקלים
המדען הראשי	02-5782	150

הצגת הבעיה

הצגת הבעיה

תאור החומרים ההומים (ח"ה) הנוצרים במערכת מסוחררת משולבת עם מערכת אנארונית (ממ"מ) ובדיקת השפעתם על דגי קוי קרפיון (ק"ק), אמנון וגופי.

תוצאות עיקריות

1. ח"ה זוהו במי הממ"מ, במזון ובדם הדגים שגודלו בממ"מ.
2. ח"ה מצטברים לאורך ציר הזמן במי הממ"מ, בעיקר בבור השיקוע.
3. חשיפת דגי ק"ק לח"ה מעלה את עמידותם להוקעה עם החיידק As.
4. חשיפת דגי גופי הנגועים בתולעת השטוחה- *Gyrodactylus*, לח"ה מפחיתה את רמת הנגיעות בתולעת.
5. לח"ה יש השפעה בקטריוסטטית על הפתוגן As בעוד שעל האוכלוסייה המיקרוביאלית האנדמית של הממ"מ, אין השפעה.
6. חשיפת דגי ק"ק לח"ה מעלה את התגובה ההומוראלית של מערכת החיסון, אך לא משפיעה על מבחן ה-NBT ועל רמת ה-Ceruloplasmin.

מטרות העבודה

1. זיהוי ח"ה ואפיון הדינאמיקה בממ"מ לאורך מחזור גידול של אמנון מכלוא.
2. הערכת ההשפעה של ח"ה על עמידות דג הק"ק להוקעה בחיידק As.
3. בדיקת ההשפעה של ח"ה על רמת הנגיעות של דגי גופי עם התולעת השטוחה *Gyrodactylus*.
4. הערכת ההשפעה של ח"ה על, (א') גדילת החיידק As, (ב') על גדילת האוכלוסייה המיקרוביאלית האנדמית לממ"מ.
5. הערכת ההשפעה של ח"ה על הפעילות של המערכת החיסון של דג הק"ק.

שיטות העבודה

1. פלורוסנציה, לזיהוי ולהערכת הריכוז של הח"ה.
2. PARAFAC, אלגוריתם המשמש לעיבוד נתוני הפלורוסנציה.
3. הוקעת דגי ק"ק שנחשפו לח"ה, עם החיידק As.
4. רמת חיזור של NBT (Nitroblue tetrazolium) ורמת Ceruloplasmin בדם דג הק"ק.
5. מיקרוסקופיה ישירה.
6. ELISA (Enzyme-linked immunosorbant assay).
7. גידול חיידקים במצעי גידול שונים.

מסקנות

1. ח"ה נוצרים ומצטברים בממ"מ בעיקר בבור השיקוע לאורך ציר הזמן.
2. פלורוסנציה בשילוב PARAFAC היא שיטה יעילה לזיהוי ולמעקב אחר ח"ה בממ"מ.
3. לח"ה יש השפעה בקטריוסטטית סלקטיבית על גדילת חיידקים.
4. לח"ה יש אפקט מגן על דגים, המושג על ידי עירור מערכת החיסון של הדג וע"י פגיעה ישירה בפתוגן.
5. לממ"מ אפקט מגן נגד פתוגנים.

ו. אישורים

הנני מאשר שקראתי את ההנחיות להגשת דיווחים לקרן המדען הראשי והדו"ח המצ"ב מוגש לפיהן

תאריך (שנה) (חודש) (יום)	רשות המחקר	אמרכלות (רשות המחקר)	מנהל המכון (פקולטה)	מנהל המחלקה	חוקר ראשי
--------------------------------	---------------	----------------------------	---------------------------	----------------	-----------

3	-----	תוכן עניינים
3	-----	דף פותח
5	-----	תקציר
7	-----	מבוא
7	-----	מטרות המחקר (כפי שהופיעו בהצעה המקורית)
15	-----	פירוט עיקרי הניסויים
16	-----	דיון
18	-----	ביבליוגרפיה

דו"ח מסכם לתכנית מחקר מספר 820-0311-14

מתוך 3

שנה: 3

השפעה של חומרים הומיים על בריאות הדגים במערכות סגורות לגידול דגים

The effect of humic substances on the health status of fish in recirculating
aquaculture systems

מוגש לקרן המדען הראשית במשרד החקלאות ע"י:

יאפ ואן ריין	מחלקה למדעי בעלי חיים, פקולטה לחקלאות, האוניברסיטה העברית בירושלים
רמי אבטליון	פקולטה למדעי החיים, אוניברסיטה בר אילן
מיכאל בוריסובר	מינהל המחקר החקלאות, מרכז וולקני

Jaap van Rijn, Department of Animal Sciences, The Robert H. Smith Faculty of
Agriculture, Food and Environment, The Hebrew University of Jerusalem. Rehovot,
P.O.B 7600. E-mail: jaap.vanrijn@mail.huji.ac.il

Rami Avtalion, Faculty of Life Sciences, Bar Ilan University. Ramat Gan, P.O.B
529002. E-mail: avtair@biu.ac.il

Michael Borisover, Agricultural Research Organization, Volcani Center. Bet Dagan,
P.O.B 50250. E-mail: vwmichel@volcani.agri.gov.il

תקציר

הצגת הבעיה

הצגת הבעיה

תאור החומרים ההומיים (ח"ה) הנוצרים במערכת מסוחררת משולבת עם מערכת אנארובית (ממ"מ) ובדיקת השפעתם על דגי קוי קרפיון (ק"ק), אמנון וגופי.

תוצאות עיקריות

1. ח"ה זוהו במי הממ"מ, במזון ובדם הדגים שגודלו בממ"מ.
2. ח"ה מצטברים לאורך ציר הזמן במי הממ"מ, בעיקר בבור השיקוע.
3. חשיפת דגי ק"ק לח"ה מעלה את עמידותם להוקעה עם החיידק As.
4. חשיפת דגי גופי הנגועים בתולעת השטוחה - *Gyrodactylus*, לח"ה מפחיתה את רמת הנגיעות בתולעת.

5. לח"ה יש השפעה בקטריוסטטית על הפתוגן As בעוד שעל האוכלוסייה המיקרוביאלית האנדמית של הממ"מ, אין השפעה.
6. חשיפת דגי ק"ק לח"ה מעלה את התגובה ההומוראלית של מערכת החיסון, אך לא משפיעה על מבחן ה-NBT ועל רמת ה-Ceruloplasmin.

מטרות העבודה

1. זיהוי ח"ה ואפיון הדינאמיקה בממ"מ לאורך מחזור גידול של אמנון מכלוא.
2. הערכת ההשפעה של ח"ה על עמידות דג הק"ק להוקעה בחיידק As.
3. בדיקת ההשפעה של ח"ה על רמת הנגיעות של דגי גופי עם התולעת השטוחה *Gyrodactylus*.
4. הערכת ההשפעה של ח"ה על, (א') גדילת החיידק As, (ב') על גדילת האוכלוסייה המיקרוביאלית האנדמית לממ"מ.
5. הערכת ההשפעה של ח"ה על הפעילות של המערכת החיסון של דג הק"ק.

שיטות העבודה

1. פלורוסנציה, לזיהוי ולהערכת הריכוז של הח"ה.
2. PARAFAC, אלגוריתם המשמש לעיבוד נתוני הפלורוסנציה.
3. הוקעת דגי ק"ק שנחשפו לח"ה, עם החיידק As.
4. רמת חיזור של NBT (Nitroblue tetrazolium) ורמת Ceruloplasmin בדם דג הק"ק.
5. מיקרוסקופיה ישירה.
6. ELISA (Enzyme-linked immunosorbant assay).
7. גידול חיידקים במצעי גידול שונים.

מסקנות

1. ח"ה נוצרים ומצטברים בממ"מ בעיקר בבור השיקוע לאורך ציר הזמן.
2. פלורוסנציה בשילוב PARAFAC היא שיטה יעילה לזיהוי ולמעקב אחר ח"ה בממ"מ.
3. לח"ה יש השפעה בקטריוסטטית סלקטיבית על גדילת חיידקים.
4. לח"ה יש אפקט מגן על דגים, המושג על ידי עירור מערכת החיסון של הדג וע"י פגיעה ישירה בפתוגן.
5. לממ"מ אפקט מגן נגד פתוגנים.

מעריכים מומלצים לבדיקת הדוח המדעי

- .1
- .2
- .3

.....

הצהרת החוקר הראשי:

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: כן/לא

חתימת החוקר: _____ תאריך: 4.5.2016

מבוא

מערכות מסוחררות הן סוג אחד של מערכות אינטנסיביות לגידול דגים. למערכות מסוחררות שני מנגנונים עבודה עיקריים: מיחזור המים דרך פילטרים ביולוגיים, המחמצנים אמוניה רעילה (NH_4^+) לחומר פחות רעיל - ניטרט (NO_3^-) וסינון המים דרך פילטרים מכניים על מנת להפחית את ריכוז החומרים האורגניים במים. במערכות מסוחררות ניתן לגדל דגים בצפיפויות גבוהות (מעל 100 ק"ג לקו"ב מים), כאשר שיעור המים המוצאים ממנה מדי יום הוא בין 5% ל-15%. המים המוצאים מן המערכת הם למעשה מי שפכים, העשירים בחומרים אורגניים ובניטרט ומהווים סיכון סביבתי כאשר הם לא מטופלים. על מנת לטפל במי השפכים, פיתחה קבוצת המחקר שלנו, בראשות פרופ' יאפון-ראיין, מערכת מסוחררת המשולבת עם מערכת טיהור אנארובית (ממ"מ), שמטרתה להפוך את הניטרט ואת החומרים האורגניים במים לגזים אטמוספריים. המערכת המסוחררת המשולבת עם מערכת הטיהור האנארובית הופעלה בהצלחה, הן במתקן ניסיוני והן במתקן מסחרי (Shnel et al., 2003; Gelfand et al., 2002). למרות התנאים האינטנסיביים וחוסר תחלופת המים במערכת, ניכר כי שיעורי התחלואה והתמותה בה נמוכים למדי, אולם עד היום לא נבדק פרמטר המקשר בין איכות המים במערכת לבית בריאות הדגים. המאפיין הבולט של המים במערכת המשולבת הוא הגוון החום שלהם, שנוצר כתוצאה מפירוק החומר האורגני במים לתרכובות אורגניות הנקראות "חומרים הומיים" (Humic Substances). חומרים הומיים נוצרים על ידי תהליכים ביוכימיים של פירוק חומרים צמחיים וחומרים מיקרוביאליים והם פעילים מאוד מבחינה כימית. הם אלה המקנים לקרקע ולמים את צבעם החום. דיווחים רבים בספרות מציינים את הקשר החיובי בין בריאות דגים לבין חשיפתם לחומרים הומיים, אם כי מרבית המידע מוגבל לספרות אפורה. נמצא כי חומרים הומיים מסוגלים גם להפחית ספיגה של מתכות כבדות בביצי דגים (Hammock et al., 2002), תכונות המעכבות חלוקה וגטטיבית של פטריית ה-*Saprolegnia*, הגורמת לפגיעה קשה באמנונים (Meinelt, 2007), תכונות בקטריסטטיות (Gryndler, 2005). בתחום הרפואה ההומנית יש דיווחים שלחומרים יש תכונות אניבקטריאליות כנגן מגוון חיידקים כגון *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* (Rensburg et al., 2000).

יש מעט דיווחים על ההשפעה של חומרים הומיים על מערכת החיסון של הדג, Meinelt et al. (2008) דיווח כי חשיפה של דגי קרפיון לחומרים הומיים גרמה לעלייה כללית במספר תאי הדם הלבנים ולעלייה ביכולת הפגוציטוזה שלהם. קיימים דיווחים כי חשיפה של עכברים לחומרים הומיים מעוררת את מערכת החיסון המולדת והנרכשת (Habiban et al., 2010), בנוסף דווח כי חשיפת עכברים לחומרים הומיים מעלה את רמת ייצור הנוגדנים לאחר חיסון (Veticka et al., 2010). לאור הדיווחים לעיל, המציגים ממצאים עקביים אודות השפעות חיוביות של חומרים הומיים על בריאותם של דגים מסוגים שונים ולאור תוצאות הניסויים הפרה למינריים שערכנו ותוצאותיהם שפורטו בהצעת המחקר הראשונית, השערת המחקר שלנו טוענת כי חומרים הומיים, אשר נוצרים

בממ"מ מקנים הגנה כנגד פתוגנים מחוללי מחלה, מהשערה זו נגזרו מטרות המחקר שיפורטו להלן לפי שנות ביצוע המחקר, חשוב לציין שמטרות המחקר בכל שנה נקבעו על סמך תוצאות המחקר שהתקבלו בשנה העוקבת. **שנת 2014**, (1) זיהוי ואפיון פלורוסנטי של תרכובות דמויות חומרים הומים בממ"מ. בעזרת מודל ה-PARAFAC, (2) תיעוד הדינאמיקה של תרכובות דמויות חומרים הומים בממ"מ, לאורך מחזור גידול של אמנון מכלוא (*Oreochromis aureus x Oreochromis niloticus*), (3) הערכת קשרי הגומלין שבין תרכובות דמויות חומרים הומים בממ"מ לבין דג אמנון המכלוא (*Oreochromis aureus x Oreochromis niloticus*), **בשנת 2015**, (1) הערכת ההשפעה של חומרים הומים ממקורות שונים על עמידות דג הקוי קרפיון (*Cyprinus carpio*) להוקעה בחיידק *Aeromonas salmonicida* הגורם למחלת Furunculosis, (2) הערכת ההשפעה של חומרים הומים ממקורות שונים על רמת החיזור של NBT (nitroblue tetrazolium) ל-Formazan ע"י רדיקלים חופשיים שמקורם בתאי הדם הלבנים ועל רמת ה-Ceruloplasmin בדגי קוי קרפיון (*Cyprinus carpio*) שעברו הוקעה עם החיידק *Aeromonas salmonicida* הגורם למחלת Furunculosis, (3) בדיקת ההשפעה של חומרים הומים ממקורות שונים על רמת הנגיעות של דגי גופי (*Poecilia reticulatas*) עם התולעת השטוחה *Gyrodactylus*, **בשנת 2016**, (1) הערכת ההשפעה הישירה של חומרים הומים ממקורות שונים על, (א) גדילת החיידק הפתוגן *Aeromonas salmonicida*, (ב) על גדילת האוכלוסייה המיקרוביאלית האנדמית לממ"מ, (2) הערכת ההשפעה של חומרים הומים על הביטוי של המערכת החיסון המולדת ומערכת החיסון הנרכשת של דג הקרפיון קוי (*Cyprinus carpio*).

מטרות המחקר (כפי שהופיעו בהצעה המקורית)

1. אפיון חומרים הומים בממ"מ סגורה במשך מחזור גידול דגים.
2. הערכת תפקוד המערכת החיסונית של דגים הגדלים בממ"מ בהשוואה לתפקודה של דגים הגדלים במערכת פתוחה.
3. בדיקת ההשפעה של חומרים הומים ומים שמקורם בממ"מ על פתוגנים של דגים.
4. שינוי הגישה אל מים חומים הנוצרים במערכות מסוחררות כאל מים מזוהמים, המצריכים ניקוי חיסוי והבהרה ויצירת גישה חדשה שלפיה מים "חומים" מסייעים לרווחת הדגים ולבריאותם.
5. הפחתת השימוש באנטיביוטיקה בענף החקלאות הימית וקידום שיטות טיפול "נקיות" יותר ופחות בעייתיות מבחינת בריאות הציבור וההשפעה הסביבתית שלהן.
6. בדיקת ההשפעה של חומרים הומים שיבודדו מהמערכת המסוחררת על מתכות כבדות.

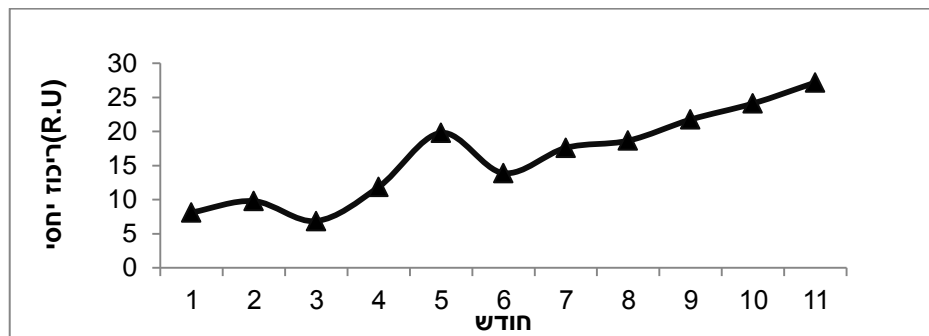
פירוט עיקרי הניסויים

שנת 2014

אפיון חומרים הומיים הנוצרים במערכת המסוחררת, דינאמיקת ההצטברות שלהם ומקום היווצרותם במערכת.

במהלך השנה דגמנו מים בתדירות של פעם בשבועיים בממ"מ הממוקמת בפקולטה לחקלאות שאוכלסה בדגי אמנון מכלוא (*Oreochromis aureus x Oreochromis niloticus*) במקביל נלקחו דוגמאות מים ממערכת סגורה למחצה לגידול דגים, דוגמאות המים עברו בדיקות פלורוסנטיות, התוצאות עובדו בעזרת מודל ה-PARAFAC. ארבע תרכובות דמויות חומרים הומיים זוהו במי הממ"מ, נמצא כי תרכובות אלו מצטברות בממ"מ לאורך ציר הזמן (איור 1) וריכוזן גבוה באופן משמעותי ממי המערכת הסגורה למחצה. בנוסף הצלחנו למצוא שהייצור העיקרי של חומרים הומיים בממ"מ מתרחש בבור השיקוע, שבו מתאפשרת הצטברות של חומר אורגני.

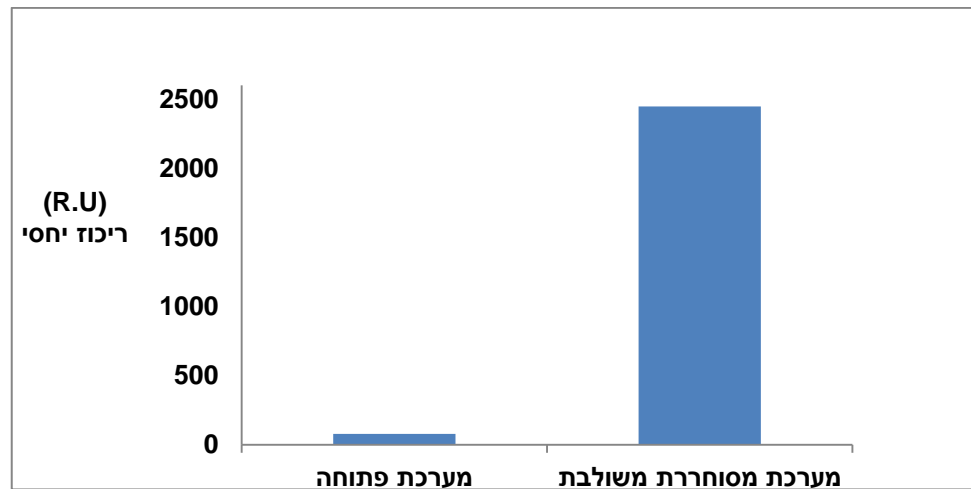
איור 1. הריכוז היחסי של חומר הומי, ביחידות של Raman units (R.U.), שזוהו במי הממ"מ לאורך מחזור גידול של דג אמנון מכלוא (*Oreochromis aureus x Oreochromis niloticus*)



המצאות של חומרים הומיים במחזור הדם של דגי אמנון.

בבדיקות פלורוסנציה לדם של דגי אמנון המכלוא (*Oreochromis aureus x Oreochromis niloticus*) שגדלו בממ"מ זוהו חומר הומי הזהה לחומר לחומר ההומי שזוהו במי הממ"מ. בנוסף נמצאה קורלציה חיובית בין ריכוז החומר ההומי במים לבין ריכוזו בדם הדג (איור 2), ממצא זה יכול להעיד כל ספיגה של חומר הומי למחזור הדם של הדג. למיטב ידיעתנו זהו הדיווח הראשון של הופעת חומר הומי במחזור הדם של דגים.

איור 2. הריכוז היחסי של החומר הומי, ביחידות Raman units, שזוהה בדם של אמנון המכלוא (*Oreochromis aureus x Oreochromis niloticus*) שגודל בממ"מ לעומת דג אמנון מכלוא שגודל במערכת פתוחה.



שנת 2015

ההשפעה של חשיפת דגי קרפיון קוי (*Cyprinus carpio*) לחומרים הומים ממקורות שונים בתור תוסף למזון ולמים על עמידותם להוקעה עם החיידק *Aeromonas salmonicida* מחולל מחלת Furunculosis.

במהלך ניסוי זה, 4 קבוצות של דגי קרפיון קוי (*Cyprinus carpio*) הואכלו במשך חודש ימים עם תוספות של חומרים הומים ממקורות שונים, (1) טבעי, (2) סינתטי, (3) ממ"מ לגידול דגים, בתור תוסף למזון. בסיום תקופה זו, החומרים ההומים הוספו בתור תוסף למים, בהתאמה למשך 3 שבועות. בסוף התקופה הדגים הודבקו באופן מלאכותי בחיידק הפתוגן *Aeromonas salmonicida* הגורם למחלת Furunculosis, לאחר ההדבקה נערכה תצפית שנמשכה 18 ימים לתיעוד תחלואת הדגים, דג שפיתח כיב, אופיין כדג חולה, דג ללא כיבים אופיין כדג בריא. מידע טכני על מקור החומר ההומי וריכוזו בטיפולים השונים מפורט בטבלה 1.

טבלה 1. תאור החומרים ההומים ששימשו בניסוי וריכוזם במזון ובמים בשלבי הניסוי השונים.

טיפול*	מקור החומר ההומי	ריכוז במזון	ריכוז במים
ביקורת	ללא חומר הומי	ללא	ללא
ממ"מ	ממ"מ	10% תוספת בוצה מיובשת מבור השיקוע של הממ"מ	מי ממ"מ המכילים חומרים הומים שזוהו בפלורוסנציה
סיגמה	חומצה הומית סינטטית, תוצרת SIGMA-ALDRICH	3%	2 מ"ג ב 1 ליטר
לאונרדייט	מיצוי של חומר הומי טבעי	3%	20 מ"ג ב 1 ליטר

*לכל טיפול היו 4 חזרות, מלבד לקבוצת הביקורת בה היו 3 חזרות, בכל חזרה היו 25 דגים.

מתוצאות הניסוי (טבלה 2), עולה בבירור שלחשיפה של דגי קרפיון קוי (*Cyprinus carpio*) לחומרים הומים ממקורות שונים יש אפקט מגן כנגד הדבקה בחיידק *Aeromonas salmonicida* שהתבטא באחוז תחלואה נמוך בהשוואה לקבוצת הביקורת.

טבלה 2. אחוז דגי הקוי קרפיון (*Cyprinus carpio*) החולים, לאחר הדבקה עם החיידק *Aeromonas salmonicida*.

טיפול	אחוז הדגים החולים לאחר ההדבקה
ביקורת	47%
מערכת מסוחררת	15%*
סיגמה	17%*
לאונרדייט	19%*

χ^2 , 0.05 > P, במבחן χ^2 .

הן בבדיקת רמת החיזור של NBT ל-Formazan והן בבדיקת רמת חלבון רמת ה-Ceruloplasmin לא נמצא הבדל משמעותי (לא מוצג).

ההשפעה של חומרים הומים ממקורות שונים על רמת הנגיעות בתולעת הטפילית- *Gyrodactylus* בדגי גופי (*Poecilia reticulata*).

בניסוי זה נבדקה ההשפעה של חומרים הומים ממקורות שונים על רמת הנגיעות בתולעת השטוחה-
Gyrodactylus בדגי גופי (*Poecilia reticulata*) שהיו נגועים בו טרם חשיפתם לחומרים הומים.
דגים הנגועים בתולעת נחשפו במשך 28 ימים לחומרים הומים שנתנו דרך המזון ובמים במקביל.
בסוף תקופת הניסוי נבדקה רמת הנגיעות בתולעת תחת מיקרוסקופ. דג, ללא תולעים, נרשם כבריא
ואילו דג שנמצאה עליו תולעת 1 ומעלה נרשם כנגוע. ריכוז החומרים במים ובמזון זהה למפרט
המופיע בניסוי הקודם (טבלה 1). בכל טיפול היו 4 חזרות כשבכל חזרה היו כ-8 דגים (סה"כ כ-32
דגים בטיפול).

מתוצאות הניסוי (טבלה 3) ניתן לראות שחשיפת הדגים לחומרים הומים הורידו את רמת הנגיעות
בתולעת השטוחה-*Gyrodactylus* בדגים אם כי רק בדגים בקבוצת הממ"מ ההבדל ברמת הנגיעות
בהשוואה לקבוצת הביקורת היה מובהק סטטיסטית.

טבלה 3. ההשפעה של חומרים הומים על רמת ההדבקה בתולעת השטוחה-*Gyrodactylus* בדגי
גופי (*Poecilia reticulata*).

טיפול	אחוז הדגים הבריאים ללא <i>Gyrodactylus</i>
ביקורת	48.4%
ממ"מ	83.3%*
סיגמה	71.4%
לאונרדייט	52.8%

* $p < 0.05$ במבחן χ^2 .

ההשפעה של חומרים הומים ממקורות שונים על גדילת החיידק *Aeromonas salmonicida* ועל גדילת האוכלוסייה המיקרוביאלית האנדמית לממ"מ לגידול דגים.

במהלך ניסוי זה חיידק *Aeromonas salmonicida* שסופק מהמעבדה המרכזית לבריאות הדג בניר דוד ודוגמה של האוכלוסייה המיקרוביאלית האנדמית של ממ"מ לגידול דגים גודלו במצע נוזלי מוגדר (Tryptic soy broth, Sigma Aldrich) ובמצע נוזלי לא מוגדר (BD Ltd., Brain heart infusion) עם תוספות של חומרים הומים ממקורות שונים, (1) ממ"מ, שמקורו במים ובבוצה ממערכת, (2) סינתטי, שמקורו מחברת Sigma Aldrich, Ltd. (3) מיצוי של חומרים הומים ממחצב בשם Leonardite, גדילת החיידק הוערכה בעזרת בדיקת הבליעה אופטית באורך גל nm540. מתוצאות הניסוי עולה בבירור כי תוספת של חומרים הומים למצע הגידול המוגדר והלא מוגדר (טבלה 4) מעקבת את גדילת החיידק *Aeromonas salmonicida*, כאשר האוכלוסייה המיקרוביאלית האנדמית למערכת המסוחררת הסגורה לא עוקבה ע"י חומרים הומים, בחלק מהטיפולים אוכלוסייה זו גדלה טוב מהביקורת.

טבלה 4. ההשפעה של חומרים הומים על גדילת החיידק *Aeromonas salmonicida* ועל גדילת האוכלוסייה המיקרוביאלית האנדמית של הממ"מ לגידול דגים.

טיפול*	מצע מוגדר - <i>Aeromonas salmonicida</i>	מצע לא מוגדר - <i>Aeromonas salmonicida</i>	מצע מוגדר - אוכלוסייה אנדמית	מצע לא מוגדר - אוכלוסייה אנדמית
גדילה בהשוואה לביקורת				
סינטטי	43%**	89%**	108%**	97%
מיצוי	58%**	63%**	93%	94%
מערכת מסוחררת	46%**	58%**	99%	97%

* בכל טיפול יש 6 חזרות.

** p<0.05 במבחן U Mann Whitney

ההשפעה של ריכוז מי הממ"מ גדילת החיידק *Aeromonas salmonicida*.

לאור הממצא כי למים מהמערכת המסוחררת יש אפקט מעקב על גדילת החיידק *Aeromonas salmonicida*, בוצע ניסוי שמטרתו לבדוק האם קיים קשר בין ריכוז מי הממ"מ לעיקוב גדילת החיידק, לשם כך מי הממ"מ במצע הגידול הלא מוגדר נמהלו בריכוזים עולים וההשפעה על גדילת

החיידק נמדדה. מתוצאות הניסוי (טבלה 5) עולה בבירור שקיים קשר בין ריכוז מי המערכת, לעיכוב גדילת החיידק *Aeromonas salmonicida*.

טבלה 5. ההשפעה של ריכוז מי הממ"מ על גדילת החיידק *Aeromonas salmonicida* במצע גידול לא מוגדר.

הגדילה בהשוואה לקבוצת הביקורת	*הריכוז היחסי של מי הממ"מ לגידול דגים במצע הגידול
92%	12.5%
88%	25%
80%**	50%
54%**	75%

**בכל טיפול יש 6 חזרות

* $p < 0.05$ במבחן U Mann Whitney

ההשפעה של חומרים הומים על מערכת החיסון המולדת והנרכשת של דג הקוי (*Cyprinus carpio*)

בניסוי זה חומרים הומים ממקורות שונים (כפי שפורט בניסוי הקודם) הוספו למי האקוואריום בהם הדגים גודלו ולמזון כך שנבדקו 5 טיפולים שונים, (1) ביקורת, ללא תוספת של חומרים הומים למזון או למים, (2) תוספת של מיצוי Leonardite למים ולמזון, (3) ממ"מ, גידול הדגים במים שמקורם בממ"מ, למזון הוספה תוספת של בוצה שמקורה בבור השיקוע של הממ"מ (4) סינטטי, תוספת של חומר הומי סינטטי למי האקוואריום ולמזון, (5) מיצוי משולב עם סינטטי, לתקופה של 30 ימים, לאחר 30 ימים הדגים חוסנו כנגד BSA (bovine serum albumin), 21 ימים לאחר חיסון הדגים, שבהם הדגים המשיכו להיחשף לחומרים ההומים במים ובמזון נלקחה בדיקת דם מהדגים שחוסנו ומהדגים שלא חוסנו.

הערכת ההשפעה של חומרים הומים על מערכת החיסון הנרכשת, ע"י בדיקת ההשפעה של חומרים הומים על רמת ההתחסנות כנגד BSA בעזרת ELISA.

בדיקת ה-ELISA בוצעה על פי הפרוטוקול המפורט ב-Avtalion (1969). מתוצאות הניסוי (טבלה 6) עולה כי דגים שנחשפו לחומרים הומים במים ובמזון לפני ואחרי החיסון, הראו ריכוז נוגדנים גבוה בהשוואה לקבוצת הביקורת, ממצא המעיד על כך שחשיפה מוקדמת של דגי קוי קרפיון (*Cyprinus*)

(*carpio*) לחומרים הומים במזון ובמים לפני חיסון ולאחריו מעלה את כושר ייצור הנוגדנים הספציפיים שלו.

טבלה 6. החציון של ריכוז הנוגדנים (log2) כנגד BSA

החציון של ריכוז הנוגדנים BSA כנגד (log2)	*טיפול
9	ביקורת
14**	מ"מ
14**	סינטטי
10	מיצוי
10	סינטטי ומיצוי

* בכל טיפול יש 5 דגים.

** $p < 0.05$, במבחן U Mann Whitney

הערכת ההשפעה של חומרים הומים על מערכת החיסון המולדת, ע"י בדיקת ההשפעה של חומרים הומים על רמת חיזור NBT ומדידת רמת ה-Ceruloplasmin

בדיקת חיזור ה-NBT ל-Formazan בוצעה על הפרוטוקול המפורט ב (Rook et al., 1985), לא נמצא הבדל ברמת חיזור ה-NBT בין קבוצת הביקורת לקבוצת הדגים שנחשפו לחומרים הומים (טבלה 7), לפני חיסון הדגים ולאחריו.

טבלה 7. החציון של רמת חיזור ה-NBT, המבוטא בבליעה האופטית באורך גל 540nm.

לאחר חיסון		לפני חיסון		טיפול
OD540nm	מספר דגים	OD540nm	מספר דגים	
0.095	5	0.161	12	ביקורת
0.088	5	0.141	13	סינטטי
0.095	9	0.1525	12	מ"מ
0.0965	8	0.15	15	מיצוי
0.096	7	0.152	15	סינטטי+מיצוי

בדיקת רמת ה-Ceruloplasmin בוצעה על פי הפרוטוקול המפורט ב-(Saho et al., 2013), מהתוצאות (טבלה 8) עולה כי חשיפת הדגים לחומרים הומים לא העלתה את רמתו בדם הדגים, בקבוצת הדגים שנבדקו לפני החיסון, נמצא שרמתו הייתה נמוכה מאשר בקבוצת הביקורת, הסבר אפשרי ל תופעה זו היא שחומרים הומים הורידו את רמת הנחושת במזון הדגים בשל יצירת קומפלקס

עם הנחושת (Kim et al., 2005), רמה נמוכה של נחושת במחזור הדם יכולה לגרום להורדת רמת ה-Ceruloplasmin בדם (DoveMed, web site).

טבלה 8. החציון של רמת ה-Ceruloplasmin, בדם של קוי קרפיון (*Cyprinus carpio*) מבוטא בבליעה האופטית באורך גל 540nm.

לאחר חיסון		לפני חיסון		טיפול
OD540nm	מספר דגים	OD540nm	מספר דגים	
0.023	7	0.07	11	ביקורת
0.035	6	0.027*	13	סינטטי
0.07	9	0.0255*	8	מערכת מסוחררת
0.0105	8	0.0255*	12	מיצוי
0.022	7	0.029	14	סינטטי+מיצוי

* $p < 0.05$, במבחן U Mann Whitney

דין

במהלך המחקר זוהו ארבעה חומרים הומים שונים במי הממ"מ, חומרים אלו נוצרים ומצטברים בממ"מ, כנראה בבור השיקוע של מערכת זו, מהעבודה עולה כי שימוש בפלורוסנציה משולבת עם PARAFAC יכולה לשמש ככלי יעיל וזמין לתיאור חומרים הומים ולמעקב אחר החומר האורגני המומס בממ"מ, (Hambly et al. (2015) תעד את הדינמיקה של החומר האורגני המומס במערכת מסוחררת לגידול דגי באס בעזרת פלורוסנציה משולבת עם PARAFAC.

על פי ממצאי המחקר לחומרים הומים יש פוטנציאל להגיב עם האורגניזמים השונים במערכת, החל בחיידקים וכלה בדגים הגדלים בה ולראייה, (1) חומרים הומים שזוהו במי המערכת, נמצאו במחזור הדם (איור 2) של אמנון המכלוא (*Oreochromis aureus x Oreochromis niloticus*) שגודל בה, (2) נמצא כי למי הממ"מ ולחומרים הומים ממקורות שונים יש אפקט בקטריוסטטי סלקטיבי על החיידק הפתוגן *Aeromonas salmonicida* (טבלה 4) ולעומת זאת מי הממ"מ והחומרים ההומים לא פוגעים בגדילת האוכלוסייה המיקרוביאלית האנדמית לממ"מ (טבלה 4). הממצא כי לחומרים הומים יש יכולת לפגוע בחיידקים פתוגנים תואם דיווחים בספרות כפי שמפורט במבוא, הממצא כי האוכלוסייה המיקרוביאלית האנדמית של הממ"מ, לא עוקבה כלל על ידי החומרים ההומים יכולה לנבוע מכך שאוכלוסייה זו עברה סלקציה לעמידות לחומרים הומים, בנוסף בספרות המדעית קיימים דיווחים על חיידקים אשר משתמשים בחומרים הומים בתור קולטי אלקטרונים (Bradley et al., 1998), או כמקור פחמן (Bano et al., 1997).

בנוסף להשפעת חומרים הומים ישירות על פתוגנים מחוללי מחלה, בעבודה זו נמצא כי לחומרים הומים יש השפעה ישירה על התגובה ההומוראלית של מערכת החיסון הנרכשת ולראייה חשיפה של דגי קרפיון קוי (*Cyprinus carpio*) לחומרים הומים העלתה את רמת הנוגדנים לאחר חיסון כנגד BSA (טבלה 6).

לא נמצאה עדות לכך שחומרים הומים מעוררים את מערכת החיסון המולדת מאחר ובשני המבחנים שנערכו, חשיפת הדגים לחומרים הומים לא העלתה את רמת חיזור ה-NBT (טבלה 7) או רמת ה-Ceruloplasmin (טבלה 8).

ממצאי המחקר מדגישים שני יתרונות בגידול דגים בממ"מ, (1) למים של מערכת זו יש יכולת לעקב באופן ישיר את גדילת החיידק *Aeromonas salmonicida* (טבלה 4, טבלה 5) ובכך להגן על דגי קרפיון קוי (*Cyprinus carpio*) כנגד מחלת Furunculosis, (2) למי המערכת יש יכולת לשפר את התגובה ההומוראלית של מערכת החיסון הנרכשת של דג הקוי קרפיון (*Cyprinus carpio*) (טבלה 6).

לסיכום אנו מעריכים שלחומרים הומים בממ"מ ובכלל יש את היכולת להגן על דגים מפני פתוגנים ע"י פגיעה ישירה של חומרים אלו בפתוגנים וע"י עירור מערכת החיסון הנרכשת של הדג.

ביבליוגרפיה

- Avtalion R.R. (1969). Temperature effect on antibody production and immunological memory, in carp (*Cyprinus carpio*) immunized against bovine serum albumin (BSA). *Immunology*, 17, 927-931.
- Bano, N., Ann Moran, M & Hodson, R.E. (1997). *Aquatic Microbial Ecology*, 12, 233-238.
- Bradley, P. M., Chapelle, F. H. & Lovley, D. R. (1998). Humic acids as electron acceptors for anaerobic microbial oxidation of vinyl chloride and dichloroethene. *Appl Environ Microbiol*, 64, 3102–3105.
- Ceruloplasmin blood test. Dovemed (2016). Retrieved by <http://www.dovemed.com/ceruloplasmin-blood-test/>.
- Gelfand, I., Barak, Y., Even-Chen, Z., Cytryn, E., Krom, M., Neori, A & van Rijn, V. (2003). A novel zero-discharge intensive seawater recirculating system for culture of marine fish. *Journal of World Aquaculture Society*, 34, 344-358.

Gryndler, M., Hrselova, H., Sudova, R., Grynderlova, H., Rezacova, V & Merhautova, V. (2005). Hyphal growth and mycorrhiza formation by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus claroideum* BEG 23 is stimulated by humic substances. *Mycorrhiza*, 15, 483–488.

Habibian, R., Morshedi, A & Delirezh, N. (2010). Effect of humic acid on humoral immune response and phagocytosis. *Global Veterinaria*, 4 (2), 135-139.

Hambly, A. C., Arvin, E., Pedersen, L.F., Pedersen, P. B., Seredynska-Sobecka, B & Stedmon, C. A. (2015). Characterizing organic matter in recirculating aquaculture systems with fluorescence EEM spectroscopy. *Water Research*, 83, 112–120.

Hammock, D., Huang, C.C., Mort, G & Swinehart, J.H. (2003). The effect of humic acid on the uptake of mercury(II), cadmium(II), and zinc(II) by Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) eggs. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 44, 83–88.

Meinelt, T., Schreckenbach, K., Pietrock, M., Heidrich, S & Steinberg, C.E.W. (2008). Humic Substances (review series). Part 1: Dissolved humic substances (HS) in aquaculture and ornamental fish breeding. *Environmental Science Pollution Research Journal*, 15 (1), 17–22.

Meinelt, T., Paul, A., Phan, T.M., Zwirnmann, E., Kruger, A., Wienke, A & Steinberg, C.E.W. (2007). Reduction in vegetative growth of the water mold *Saprolegnia parasitica* (Coker) by humic substance of different origins. *Aquatic Toxicology*, 83, 93–103.

Rice, E.W. (1986). Ceruloplasmin assay in serum: standardization of ceruloplasmin activity in terms of international enzyme units. *Diagnosis Laboratory*, 12, 39-53.

Rook, G.A.W, J., Steele, S., Umar & Dockrell, H.M. (1985). A simple method for the solubilisation of reduced NBT, and its use as a colorimetric assay for activation of

human macrophage by gamma interferon. *Journal of Immunological Methods*, 82, 161-167.

Sahoo, P.K., Das, W.S., Mahapatra, K.D., Saha, J.N., Baranski, M., Odegard, J & Robinson, N. (2013). Characterization of the ceruloplasmin gene and its potential role as an indirect marker for selection to *Aeromonas hydrophila* resistance in rohu, *Labeo rohita*. *Fish & Shellfish Immunology*, 34, 1325-1334.

Shnel, N., Barak, Y., Ezer, T., Dafni, Z & van Rijn, J. (2002). Design and performance of a zero-discharge tilapia recirculating system. *Aquacultural Engineering*, 26, 191-203.

van Rensburg, C.E.J., van Straten, A. & Dekker, J. (2000). An in vitro investigation of the antimicrobial activity of oxifulvic acid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46, 853-854.

Vetvicka, V., Baigorri, R., Zamarreio, A.M., Garcia-Mina, J.M & Yvin, J.C. (2010). Glucan and humic acid: synergistic effects on the immune system. *Journal of Medicinal Food*, 13 (4), 863-869.

סיכום עם שאלות מנחות

נא להתייחס לכל השאלות בקצרה ולעניין, ב-3 עד 4 שורות לכל שאלה (לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת).

שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר.

הערה: נא לציין הפנייה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
1. זיהוי חומרים הומים (ח"ה) ואפיון הדינאמיקה שלהם בממ"מ לאורך מחזור גידול של אמנון מכלוא.
2. הערכת ההשפעה של ח"ה על עמידות הדג כנגד פתוגנים שונים.
3. הערכת ההשפעה של ח"ה על מערכת החיסון של דג הקוי קרפיון.
5. הערכת ההשפעה של ח"ה על גדילת מיקרואורגניזמים.
עיקרי התוצאות
1. ח"ה נוצרים ומצטברים הממ"מ לאורך מחזור הגידול, הח"ה מצטברים בבור השיקוע.
2. ח"ה, נספגים למחזור הדם של דג האמנון.
3. ח"ה מפחיתים את רמת הנגיעות של דג הגופי עם התולעת השטוחה <i>Gyrodactylus</i> .
4. ח"ה מעלים את עמידות דג הקוי קרפיון להוקעה עם החיידק <i>Aeromonas salmonicida</i> .
5. ח"ה מעלים את עצמת התגובה ההומוראלית של מערכת החיסון הנרכשת.
7. ח"ה מעקבים את גדילת החיידק <i>Aeromonas salmonicida</i> ולא משפיעים על גדילת האוכלוסיה המיקרוביאלית של הממ"מ.
מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדו"ח?
6. ח"ה נוצרים ומצטברים בממ"מ בעיקר בבור השיקוע לאורך ציר הזמן.
7. פלורוסנציה בשילוב PARAFAC היא שיטה יעילה לזיהוי ולמעקב אחר ח"ה בממ"מ.
8. לח"ה יש השפעה בקטריוסטטית סלקטיבית על גדילת חיידקים.
9. לח"ה יש אפקט מגן על דגים, המושג על ידי עירור מערכת החיסון של הדג וע"י פגיעה ישירה בפתוגן.
בעיות שנתרו לפתרון ו/או שינויים טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים שחלו במהלך העבודה
עיקר מטרות המחקר הושגו.
הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - <u>ציטט</u> ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי;
3 מאמרים נמצאים בשלבי כתיבה: (1) הדינאמיקה של חומרים הומים במערכות מסוחררות, (2) האפקט המגן של חומרים כנגד מחלות זיהומיות, (3) ההשפעה של חומרים הומים על מערכת החיסון של דג הקוי קרפיון.
פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)
<ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט) XXX
<חסוי – לא לפרסום: יש לצרף אישור ומידע ממוסד המחקר
האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? כן* - לא -

*יש לענות על שאלה זו רק בדו"ח שנה ראשונה במחקר שאושר לשנתיים, או בדו"ח שנה שניה במחקר שאושר לשלוש שנים